從繡球花的花色變化探討

植物耐鋁性與有機酸的關係

＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊ ◎農試所農藝組　顏信沐　王強生

一、前　　言

在地殼組成分中，鋁僅次於氧及矽，約佔有7%。因此，植物根系幾乎常暴露於鋁中，大部分的鋁是無害的氧化物及鋁矽酸鹽(aluminosilicates)。然而在酸性土壤中，鋁溶解成三價鋁離子Al^{+3}對植物具有毒性，鋁毒被認為是酸性土壤限制植物生產力的主要因素，而且酸性土壤佔地球現有可耕地達40%，因此成為一值得重視的問題。

鋁離子在10^{-6}M的濃度就能在極短時間內，抑制許多重要作物的根系生長，而且它在營養及水分吸收上產生的後續效應，常可導致植物生長不良及產量降低。

造成鋁毒的機制仍屬未知，但因鋁與供氧化合物形成強力鍵結，這些物質能與根細胞之非原生質(apoplasm)與原生質 (symplasm)產生多重結合反應，所以兩者的結合可能是造成鋁毒的重要原因。

有些植物發展出耐鋁逆境的機制，有助其生長於酸性土壤。逆境生理學家進行研究，以瞭解這些耐受機制的性質，許多現有證據指出：在根細胞質或根與土壤交界面，有些有機酸會以複合態方式將Al^{+3}解毒。

二、利用有機酸將鋁離子解毒到根外

當施以鋁處理時，有超過12種以上耐鋁植物的根部會有分泌有機酸的反應，通常是檸檬酸、草酸或蘋果酸，這些有機酸離子能和鋁離子形成複合物來保護植物的根部。耐鋁的小麥品種根部可釋出蘋果酸；玉米、大豆與菜豆可釋出檸檬酸；蕎麥與芋頭可釋出草酸；黑小麥、油菜、燕麥、蘿蔔與裸麥則可釋出檸檬酸及蘋果酸。前述植物中，有些由根部所分泌的有機酸，會集中於根尖，並依據根外溶液中鋁離子存在情形調整釋出。

植物不可能而且不必要對土壤中所有鋁離子均以根部分泌物的方式予以解毒，因為根尖對鋁離子特別敏感，所以只有圍繞在根尖細胞的離子需要迅速排毒，因此將釋出的有機酸侷限在根尖區域可減低耐鋁毒機制所耗費的能量是較明智的方式。

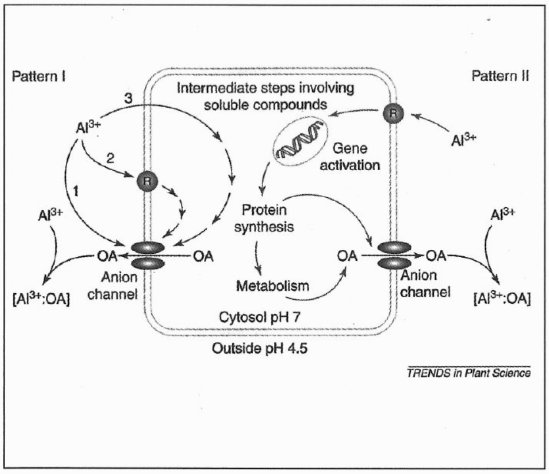
當根尖穿透酸性土壤時，有機酸可能擴散或被微生物分解，因此必需持續分泌加以補充，我們可以想像有機酸在根尖形成保護鞘，將有毒的鋁離子阻隔在外的狀況。

在不同作物中，已有兩類有機酸分泌作用被確認，第一型為快速釋放型：當鋁加入後，有機酸立即釋出，兩者間幾乎沒有延

作者：顏助理研究員信沐
聯絡電話：04-23302301轉138

遲，例如小麥及蕎麥，當鋁處理後15至30分鐘內，就可以分別偵測出蘋果酸或草酸的釋出。第二型為延遲釋放型：有機酸延遲至暴露於鋁達數小時後才釋出，如決明（*Cassia tora*），在鋁處理後4小時，檸檬酸釋出量達最高，而裸麥在10小時期間，檸檬酸及蘋果酸緩慢釋出；在玉米則發現具有上述兩種型式，鋁可誘導檸檬酸在48小時內快速流出或延遲釋放。

由第一型反應的快速顯示，鋁活化係一既存機制，不須誘導產生新的蛋白質，鋁可能只是活化原生質膜上的轉運子（transporter）來啓動有機酸離子釋出。相反的，第二型的延遲分泌顯示：有些參與有機酸代謝或轉運的蛋白質需要被誘導產生（圖一）。



圖一、植物根部受鋁刺激分泌有機酸（OA）模式圖
有機酸離子能與鋁離子形成穩定複合物以去除根圈鋁毒。
第一型反應：鋁以三種可能方式活化原生質膜（有機酸可通透）上的陰離子通道。
第二型反應：鋁經由原生質膜上接受子蛋白質（R）與細胞反應，誘導編譯基因的轉譯作用，以活化參與有機酸代謝或轉運的蛋白質。

三、根經由離子通道 (ion channels) 分泌有機酸離子

為去除根圈鋁毒，有機酸必須從細胞質運轉到非原生質，在接近中性的細胞質內，有機酸幾乎與質子完全分離，以陰離子的形式存在，才能被轉運至根部細胞外。在根部發現的許多有機酸，只有少數特定一、二種是因應鋁處理而分泌的，由此顯示：在原生質膜存在一特定的有機酸離子轉運系統。在小麥及玉米，此系統已經被確認為一陰離子通道（anion channel），陰離子通道是膜結合轉運蛋白質，它可以讓被動陰離子流降低電化學梯度(electrochemical gradient)，植物細胞原生質膜兩端產生巨大電位差(electrical potential different)，可確保離子由細胞質移至非原生質。

在小麥根部原生質體上斑夾(patch-clamp)的研究顯示，鋁離子活化一原生質膜上可讓蘋果酸及氯離子通透的陰離子通道。利用單基因差異的小麥近同源品系為材料，比較兩者在鋁處理後內部電流發現耐鋁基因型的原生質體產生的電流大而且頻度較高。在一相似玉米耐鋁研究中，也發現鋁活化原生質膜上的離子通道，分泌檸檬酸來反應鋁處理；另一個玉米試驗報告指出：被鋁活化的離子通道允許檸檬酸及蘋果酸通透，並以耐鋁基因型品系表現較為強烈。

雖然目前仍然不知道鋁如何活化這些陰離子通道，但有三個可能性被提出：

(一)鋁直接和通道蛋白質反應以啓動並且開啓陰離子通道。

(二)鋁和膜表面上特定接受器或膜本身反應，啓動一個二次訊息傳遞系統，因而活化離子通道。

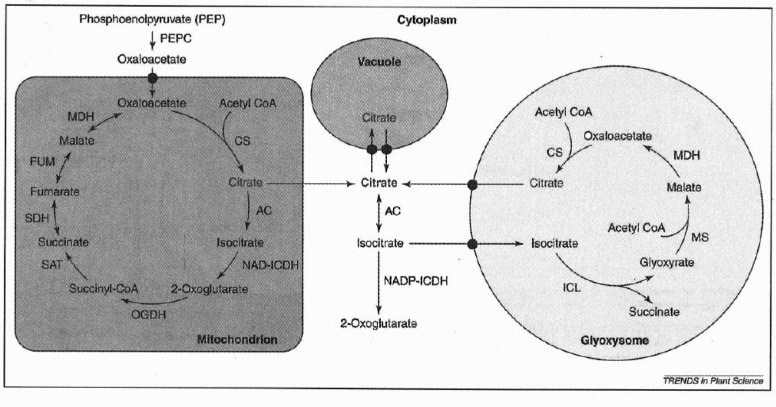
(三)鋁進入細胞質直接活化，或間接經由二次訊息活化離子通道（圖一）。

最近從玉米獲得的證據顯示，鋁能活化分離的膜片段上的通道，顯示二次訊息是不必要的，或者是與膜結合的，而且能釋出大量有機酸的耐鋁基因型與少量或不釋出的敏感型，這三者間的差別到目前也還不清楚，可能是每一基因型膜上通道蛋白質數目，或是對有機酸離子通透性，或者是受鋁活化等的差異所致，這些問題要一直到通道蛋白質或編碼這些通道密碼的基因被分離，才能獲得解答。但是無論如何，從這些研究可以獲得的結論就是：陰離子通道能調控被鋁活化的根部有機酸分泌作用。

四、有機酸代謝的變化及其分泌作用

有關鋁如何影響植物有機酸代謝，只有在少數物種曾被研究。雖然在一些物種有機酸代謝能改變以促進有機酸離子快速分泌(第一型)，但這些植物合成有機酸的能力並不受鋁影響。舉例來說，就小麥耐鋁基因型與敏感型及有無鋁處理間來比較磷酸烯醇丙酮酸羧化酵素(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPCase)、NAD-蘋果酸脫氫酵素(NAD-malate dehydrogenase, NAD-MDH)、檸檬酸合成酵素(citrate synthase)或NADP依賴型異檸檬酸脫氫酵素(NADP-dependent isocitrate dehydrogenase)等酵素活性的表現，發現並無差異；甚至在耐鋁植株根部有大量蘋果酸流失的狀況下，結果也是相同（圖二）。這些發現顯示，小麥有關蘋果酸生合成的酵素並不受速率限制，此外，耐鋁基因型植株細胞質流失蘋果酸，會導致既有酵素活性的改變，以補充內部蘋果酸庫。

觀察參與有機酸生合成酵素的活性變化發現，有一些物種在鋁加入與有機酸的釋出時間有一段差距 (第二型)，如裸麥，在鋁加入後，根尖檸檬酸合成酵素活性增加30%，但是PEPCase、NAD-MDH、及NADP依賴型異檸檬酸脫氫酵素等之活性並無影響；而



圖二、檸檬酸生合成（CS, PEP , MDH）及降解（AC , NAD-ICDH , NAD-ICDH）等作用有關酵素活性的改變可導致細胞質內檸檬酸累積。

AC, 烏頭酸酵素；CS, 檸檬酸合成酵素；FUM, 延胡索酸酵素；ICL, 異檸檬酸裂解酵素；MDH, 蘋果酸脫氫酵素；MS, 蘋果酸合成酵素； OGDH, 酮戊二酸脫氫酵素；PEPC, 磷酸烯醇丙酮酸羧化酵素；SAT, 琥珀酸硫激酵素；SDH, 琥珀酸脫氫酵素。

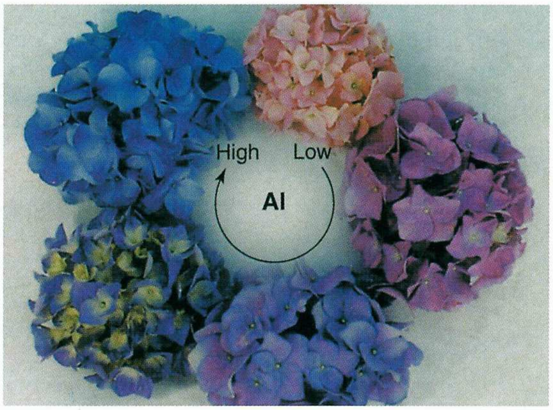
在6小時後，檸檬酸合成酵素活性才增加，恰好是檸檬酸開始大量流出前。雖然，檸檬酸合成酵素活性增加，顯示生成檸檬酸的能力提高，但是，截至目前爲止，並無直接證據顯示植物爲了分泌有機酸，而必須改變代謝。

許多實驗群嘗試運用基因工程，如操控檸檬酸代謝來增加有機酸釋出的方式，用來提高菸草、木瓜、水稻與玉米等作物的耐鋁性。例如綠膿桿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）檸檬酸合成酵素基因在轉殖菸草品系表現，顯示增加內部檸檬酸濃度可促進檸檬酸釋出及增進鋁忍受性；雖然，仍有部分試驗結果令人懷疑，但並不表示利用轉殖有機酸合成酵素基因至重要作物，以提高有機酸分泌、累積的策略不可行。

在阿拉伯芥高度表現(over expression)胡蘿蔔粒腺體檸檬酸合成酵素，會導致酵素活性、檸檬酸濃度增加及多出60% 的檸檬酸釋出，這些改變與微幅增進鋁忍受性相符，在轉殖植物檸檬酸合成能力提高與釋出量增加的相關性，顯示改變代謝也可以操控有機酸分泌作用。

五、有機酸去除內部鋁毒

有些鋁忍受性高的物種，能在地上部累積高濃度的鋁，卻不呈現鋁毒害癥狀，置於鋁溶液僅5天的蕎麥葉，即可累積超過400毫克/公斤乾物重的鋁；而生長在酸性土壤上時，更可高達15,000毫克/公斤乾物重。繡球花(Hydrangea)在數月的生長期中，葉片累積極高濃度（大於3000毫克/公斤乾物重），隨著鋁濃度增加，花瓣則由粉紅轉為藍色 (圖三)。藍色的繡球花瓣是因花翠素3-葡萄糖苷(delphinidin 3-glucoside)、鋁及3-咖啡醯奎寧酸(3-caffeoylquinic acid)的複合物形成而呈現藍色；鋁被認爲是扮演穩定此二有機化合物之角色，繡球花葉片中水溶性鋁約佔總量的80%，且細胞液中鋁濃度可高達13.7mM。



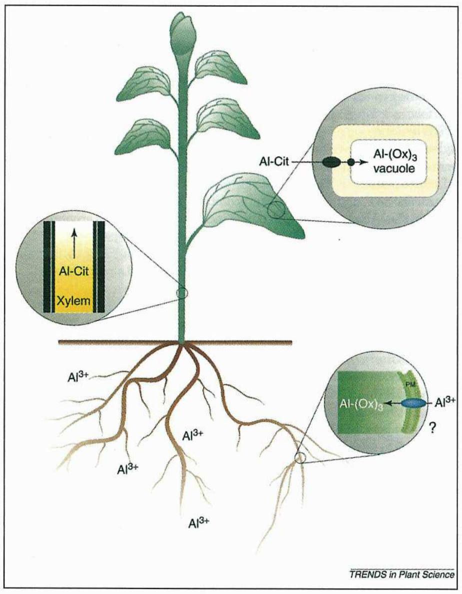
圖三、繡球花花瓣在不同鋁含量下所呈現的顏色
（花瓣由粉紅至藍色時的鋁濃度為51、106、640、804及3959毫克/公斤乾物重。）

由於溶液內酸鹼值依賴型鋁水解作用及不溶性氫氧化鋁的形成，造成在原生質內游離Al^{+3}濃度小於10^{-10}M，因其對氧配位體(ligand)具有強烈親合性，所以即使在如此低的濃度也仍具毒性。例如：鋁離子對ATP鍵結力約爲Mg^{+2}的10^7倍，因此，在細胞中只要有小於10^{-9}M的鋁離子就可輕易搶先與ATP鍵結，因此累積鋁的植物必須運用有效的機制以去除內部的鋁離子。

最近的研究證據顯示：上述高鋁忍受性物種，以形成鋁-有機酸複合物的方式，來去除內部鋁毒，利用核磁共振技術已鑑定出該複合物在繡球花葉片爲鋁-檸檬酸 (1：1)，在蕎麥則是鋁-草酸(1：3)，兩者的穩定度均較Al-ATP複合物高出很多。

最近的假說是：這種螯合作用（chelation）能有效降低細胞質內鋁離子活性，避免其與敏感的細胞組成分形成複合物。在十徒野牡丹（*Melastoma malabathricum*）植株內，鋁以離子形態存在或與草酸結合形成1：1、1：2或1：3不同的複合物，除了1：3形式外，其他均仍具有毒性，因此他們可能是被儲存於液泡內。

在蕎麥，鋁在吸收、轉運與累積過程中，會發生化學形式的改變，由於內部極大的電化學梯度影響，被根部吸收的爲三價鋁離子，當其被吸收至根部後，鋁離子即被根部內的草酸螯合形成鋁-草酸（Al-oxalate）1：3複合物，此複合物被運送至木質部時，會發生配位體交換反應而形成鋁-檸檬酸複合物，當鋁從木質部卸載至葉片細胞時，另一配位體交換反應發生，再度形成鋁-草酸複合物，然後儲存於液泡內（圖四）。



圖四、鋁以不同形式在蕎麥植株內分布與被吸收。
(Cit，檸檬酸；Ox，草酸；PM，原生質膜)

六、結　語

酸性土壤散佈於全世界，特別是集中在熱帶區域。開發中國家人民艱苦地仰賴季節性糧食生產以維生計。當我們在選擇改變耕作方式或施用石灰中和酸性等傳統方法，減輕土壤酸化程度，遭遇窒礙難行狀況時，本文提供解決鋁毒的替代策略以解決其酸性土壤的糧食生產問題，應是值得重視的。

研究維持甚至增進酸性土壤的生產力的方法即是開發更耐鋁逆境的作物及牧草，有些物種可經由傳統育種策略達成，但對一些耐鋁性自然變異很小的物種而言，基因操作提供一個新的方向。

雖然，我們對鋁如何活化根部的離子通道（第一型），及反應延遲期的特性（第二型），及鋁如何穿越膜及在植物中被轉運，及配位體如何發生交換反應等過程仍未完全瞭解。但對某些物種而言，有機酸與鋁耐受機制有密切關連，因此操縱有機酸生合成或分解的研究，將有助於釐清作物耐鋁機制。此外，已有許多與有機酸代謝有關的關鍵酵素的基因被選殖，使得利用基因操作提高作物對鋁的耐性，用來提高作物生產力的策略更爲可行。

本文摘譯自：

Ma. J. F., Ryan, P. R. and Delhaize, E. 2001. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. Trends Plant Sci. 6:273-278.